

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 17/02/2019.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE
MEMBRANA SINOVIAL EQUINA INSERIDAS EM MICROCÁPSULAS DE
HIDROGEL DE ALGINATO**

VITOR HUGO DOS SANTOS

BOTUCATU – SP
ABRIL/2017

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE
MEMBRANA SINOVIAL EQUINA INSERIDAS EM MICROCÁPSULAS DE
HIDROGEL DE ALGINATO**

VITOR HUGO DOS SANTOS

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal para
obtenção de Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Adj. Ana Liz Garcia Alves

BOTUCATU – SP
ABRIL/2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Vitor Hugo dos.

Avaliação das células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina inseridas em microcápsulas de Hidrogel de alginato / Vitor Hugo dos Santos. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501070

1. Equino - Doenças. 2. Osteoartrite. 3. Cartilagem articular - Ferimentos e lesões. 4. Membranas sinoviais. 5. Terapia celular. 6. Células-tronco. 7. Patrimônio genético.

Palavras-chave: Arcabouço; Equinos; Osteoartrite; Terapia celular.

Vitor Hugo dos Santos

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE
MEMBRANA SINOVIAL EQUINA INSERIDAS EM MICROCÁPSULAS DE
HIDROGEL DE ALGINATO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Adj. Ana Liz Garcia Alves

Presidente e Orientadora

*Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária - FMVZ/UNESP -
Botucatu-SP*

Dr^a Bruna De Vita

Membro

Departamento de Reprodução Animal - FMVZ/UNESP - Botucatu-SP

Dr. Leandro Maia

Membro

*Secretaria de Saúde - Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de
Botucatu/SP*

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo.

A minha família querida, que é meu porto seguro. Aos meus pais Edson e Rose, que estiveram ao meu lado em todas as adversidades, me ensinando, me motivando e me amparando sempre. Se não fosse por vocês eu certamente não chegaria até aqui hoje. O meu irmão Bruno que muito me motivou com sua amizade, atenção e carinho. Amo vocês.

A minha orientadora, Professora. Dra. Ana Liz Garcia Alves, não somente pelos diversos ensinamentos e confiança depositados em mim e em meu trabalho.

A minha namorada e amiga Gabriela, agradeço pelo apoio em todos os momentos nesses últimos três anos. Seu companheirismo diário me confortou e me deu coragem e ânimo para obter sucesso nessa jornada. Te amo.

Aos todos amigos pela enorme ajuda.

A toda a minha equipe de pesquisa, João Pedro, Jaqueline, Betsabeia, André, Caio, Luiz Henrique, Gustavo e Mariana, orientados pela Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves, pelo coleguismo e auxílio.

A Professora Marjorie e Elenice Deffune pelo auxílio com os cultivos, processamento e análise das amostras.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial a técnica Shelly pelo auxílio com o processamento e leitura dos cortes histológicos.

A todos os colegas da pós-graduação, pelo companheirismo e horas de descontração.

Ao Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu, que me receberam de portas abertas e me proporcionaram a oportunidade de grandes aprendizados e experiências.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, que me permitiu a dedicação exclusiva a Pós graduação e a realização deste trabalho.

E a todos que, contribuíram direta e indiretamente, fizeram parte desta história.

SUMÁRIO

	PAGINAS
<i>CAPÍTULO 1</i>	01
1. INTRODUÇÃO	01
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	04
1.2.1. A OA nos equinos.....	04
1.2.2. Terapia Celular na osteoartrite equina.....	06
1.2.3. Cultivo CTM MS em tres dimensões (3D).....	08
1.2.4. Identificação celular nos tecidos.....	11
REFERÊNCIAS	13
<i>CAPÍTULO 2</i>	21
2. ARTIGOS CIENTÍFICOS	21
2.1. Cultivo de células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial equina em microcápsulas de hidrogel de alginato	21
2.2. Avaliação da migração das células tronco mesenquimais inseridas em microcápsulas de hidrogel de alginato em equinos	48

SANTOS, V. H. **Avaliação das células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina inseridas em microcápsulas de hidrogel de alginato**. Botucatu, 2017, 74p. Dissertação - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, FMVZ - Campus de Botucatu.

RESUMO

Animais com lesão na cartilagem articular, decorrente da osteoartrite, apresentam-se como um desafio para a Medicina Veterinária, pois o reparo cartilagíneo nunca é completo quando técnicas convencionais de tratamento são utilizadas. Os avanços médicos e pesquisas relacionadas têm mostrado crescente interesse na utilização da terapia celular com células tronco mesenquimais derivadas da membrana sinovial (CTM_{MS}) no tratamento destas lesões, buscando proporcionar total reparo da cartilagem lesada e promover a imunomodulação necessária para o controle do processo inflamatório. Além disso, existem dúvidas quanto à persistência, comportamento das células e a migração a outros locais inflamados. Desta forma este estudo teve como objetivo cultivar e avaliar a viabilidade de CTM_{MS} encapsuladas em um arcabouço tridimensional composto de hidrogel de alginato (HA). Adicionalmente avaliar a migração celular utilizando o nanocristal Qtracker 655. Para isso, fragmentos de membrana sinovial foram coletados da articulação metatarsofalangeana de equinos por cirurgia astros cópica, submetidos à digestão enzimática e cultivados em monocamadas. As células foram encapsuladas em várias concentrações: 10⁴; 20⁴; 50⁴; 10⁵; 20⁵ células em solução de alginato de sódio a 1,5% (w/v). Em seguida, fez-se o processo de gelatinização em CaCl₂ (102 mM), permitindo a formação do HA, com posterior cultivo em meio DMEM Knockout durante quatro semanas. A viabilidade, proliferação e diferenciação das células foram realizadas através da dissolução das microcápsulas em citrato de sódio e contagem com azul de tripan, e a diferenciação através dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE) e azul de toluidina (AT). Para avaliar a migração celular *in vivo* utilizou-se a citometria de fluxo até os 21 dias e cortes histológicos em microscopia de fluorescência aos sete dias. Houve um aumento no número e na viabilidade das CTMs durante as quatro semanas de cultura nas microcápsulas com 10⁴, 10⁵ e 20⁵ células. Através das análises histológicas dos HAs corados com azul de toluidina e HE foi possível observar a distribuição

definida dos condrócitos no hidrogel, assemelhando-se a grupos isógenos e formação de matriz territorial. As células migraram expressivamente para membrana sinovial, sendo encontradas também em estruturas adjacentes, comprovando a quimiotaxia pela inflamação. Este estudo demonstrou a eficiência do HA como arcabouço para ser utilizado na cultura de CTM_{MS} mantendo a viabilidade e estimulando a diferenciação condrogênica e o nanocristal mostrou ser eficiente na marcação das CTM_{MS}, não alterando a sua viabilidade, permitindo avaliação da migração celular *in vivo* na articulação dos equinos.

Palavras-chave: equinos; osteoartrite; terapia celular; arcabouço.

SANTOS, V. H. **Evaluation of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules.** Botucatu, 2017, 74p. Dissertation (Masters) – University of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, State University of São Paulo.

ABSTRACT

Animals with joint cartilage damage resulting from osteoarthritis present a challenge for Veterinary Medicine, since cartilage repair is never complete when conventional treatment techniques are used. Medical advances and related research have shown increasing interest in the use of cell therapy with mesenchymal stem cells derived from the synovial membrane (MSC_{SM}) in the treatment of these lesions, seeking to provide total repair of injured cartilage and to promote the immunomodulation necessary to control the inflammatory process. In addition, there are doubts about the persistence, behavior of cells and migration to other inflamed sites. In this way, this study aimed to cultivate and evaluate a viability of MSC_{SM} encapsulated in a three-dimensional scaffold composed of alginate hydrogel (HA) 655. For this, fragments of synovial membrane were collected from the metatarsophalangeal joint of horses by arthroscopic surgery, submitted to enzymatic digestion and cultured in monolayers. The cells were resuspended in various concentrations: 10⁴; 20⁴; 50⁴; 10⁵; 20⁵ cells in 1.5% (w/v) sodium alginate solution. The gelatinization process was then carried out in CaCl₂ (102 mM), allowing the formation of HA, with subsequent culturing in DMEM Knockout medium for four weeks. Cell viability, proliferation and differentiation were performed by dissolving microcapsules in sodium citrate and counting with trypan blue, and differentiation through histological sections stained with hematoxylin and eosin (HE) and toluidine blue (AT). To evaluate cell migration in vivo, flow cytometry was used up to 21 days and histological sections under fluorescence microscopy at 7 days. There was an increase in the number and viability of MSCs during the four weeks of culture in the microcapsules with 10⁴, 10⁵ and 20⁵ cells. Through the histological analysis of HAs stained with toluidine blue and HE it was possible to observe the defined distribution of chondrocytes in the hydrogel, resembling isogenic groups and formation of a territorial matrix. The cells migrated expressively to synovial membrane, being also found in adjacent structures, proving chemotaxis by inflammation. This study

demonstrated the efficiency of the HA as a scaffold to be used in the culture of MSC_{MS} maintaining viability and stimulating the chondrogenic and nanocrystal differentiation was shown to be efficient in the labeling of the MSC_{MS}, not altering its viability, allowing evaluation of cellular migration in vivo the equine joint.

Keywords: equines; Osteoarthritis; Cell therapy; Scaffold.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e o terceiro mundial. Somados aos muares e asininos, são oito milhões de cabeças que movimentam um mercado de sete bilhões de reais por ano. O rebanho engloba mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final, e compõe a base do chamado “Complexo do Agronegócio Cavalo”, responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2016). O esporte equestre está amplamente difundido no Brasil. Estima-se que cerca de 50 mil cavalos atletas pratiquem esportes hípicos nas diversas modalidades: salto, vaquejada, corrida, adestramento, entre outras (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2004). Apesar da maior parte dos cavalos do país ser voltada ao trabalho no campo, são os cerca de 20% dedicados ao esporte e ao lazer que impulsiona o mercado equestre no Brasil (LIMA, 2006). Assim, é notória a importância atual do equino atleta em nosso país.

Considerando este fato, tornam-se extremamente relevantes as enfermidades que possam diminuir o desempenho atlético desses animais. A osteoartrite (OA) é uma das principais causas de claudicação em equinos, e está associada com baixo rendimento do equino atleta, incapacitação física e retirada precoce do animal das atividades esportivas (FRISBIE et al., 2007). Esta enfermidade afeta principalmente a cartilagem articular, porém acomete

todo o conjunto da articulação (osso, cápsula, membrana sinovial, ligamentos, tecidos periarticulares (MCILWRAITH et al., 2012). Além disso, a OA implica em grandes prejuízos econômicos para a indústria do cavalo atleta (FRISBIE et al., 2007; SUTTON et al., 2009), sendo uma doença altamente incapacitante e de tratamento complexo (MONTEIRO et al., 2015). As lesões condrais articulares extensas são frequentes nesses equinos, independente da idade ou tipo de exercício realizado (MONTEIRO et al., 2015). Essas lesões apresentam grande dificuldade na reparação e consequências deletérias a longo prazo (NIXON et al., 2015).

Vários estudos foram realizados avaliando a eficácia do tratamento da OA por completo (FRISBIE et al., 2009; GOBBI, 2011; MILANO et al., 2010, YAMADA et al., 2013), mas a reparação condral ainda é dependente de processos intrínsecos e extrínsecos, correlacionados principalmente com a matriz extracelular, e constantemente o tecido de reparação se torna fibrocartilagem, com perda de função (YAMADA et al., 2013; MAZOR et al., 2014).

Frente a esta situação, inúmeros pesquisadores buscam superar os desafios do processo de reparação da cartilagem. A bioengenharia tecidual está sendo utilizada como um adjuvante em tratamentos convencionais, contribuindo de forma significativa não apenas para a redução da destruição articular e da dor, mas também como uma alternativa terapêutica de regeneração (KOCH et al., 2009; VINATIER et al., 2009; GOBBI, 2011; YAMADA et al., 2013; MADEIRA et al., 2015).

Implantes de células tronco mesenquimais (CTM) em lesões condrais demonstram ser promissores, representando uma alternativa terapêutica (VINATIER et al., 2009), contornando a limitada reparação cartilaginosa, reduzindo a formação de fibrocartilagem e bloqueando o ciclo inflamatório articular expressando moléculas anti-inflamatórias como a IL-10, o antagonista de interleucina 1 (IL-1ra), indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), TGF- β e PGE₂ (SHI et al., 2012; LENT & BERG, 2013; YAMADA et al., 2013), o que resultaria em baixa morbidade e no tratamento completo da osteoartrite, quando comparado com as terapias e técnicas cirúrgicas habituais e atualmente

disponíveis (YAMADA et al., 2013; MCILWRAITH et al., 2011; CARRADE et al., 2011; RAHEJA et al., 2011; ANDERSON et al., 2014; TSUZUKI et al., 2014).

Uma condição fundamental para a utilização das CTM na reparação de defeitos condrais é o método de aplicação e a manutenção dessas células no sítio de ação. Inúmeros métodos têm sido estudados no intuito de garantir o melhor desempenho das CTM no local da lesão (NÖTH et al., 2008). No caso dos condrócitos, o hidrogel de alginato (HA) têm sido o método mais indicado (FRESHNEY, 2000) por proporcionar o arcabouço tridimensional requerido por esse tipo celular para evitar sua desdiferenciação e também por favorecer a permanência das CTM no local da lesão, evitando que as células migrem no organismo do animal. Häuselmann et al. (1994) e Bittencourt et al. (2009) utilizaram alginato de sódio e obtiveram bons resultados de proliferação celular, viabilidade e produção de moléculas específicas de cartilagem, utilizando bovinos e ratos, respectivamente como modelo experimental.

A avaliação da manutenção das células e sua diferenciação no tecido ao qual as células são implantadas necessitam ser detectadas (KAUR & SINGHAL, 2011). Diversas marcações celulares têm sido estudadas, dentre estas estão disponíveis os pontos quânticos (WU & BRUCHEZ, 2004). Dificuldades são encontradas em se marcar as células a serem transplantadas, assim como avaliar o seu destino *in vivo*, obtendo resultados controversos e de limitações técnicas (OLIVEIRA et al., 2009).

Os pontos quânticos (QDs) são formados por nanocristais semicondutores, excitáveis e fotoestáveis, podendo ser estimulados por um único comprimento de onda (AZZAZY et al., 2006). Os QDs são atóxicos às células e sua fluorescência continua ativa por um tempo 100 vezes maior se comparado a corantes orgânicos (MARSH et al., 2007). Os nanocristais provêm luminosidade e fluorescência que podem ser observados por horas em tecidos marcados, ainda podem ser arquivados permanentemente e são capazes de marcar quase todos os tipos de material de interesse biológico (PARAK et al., 2005). A fluorescência do nanocristal pode ser detectada por pelo menos quatro gerações celulares, sendo que algumas células podem permanecer marcadas por até duas semanas (DONALDSON et al., 2004).

As CTM derivadas de membrana e líquido sinoviais são fontes tecido específicas, com elevado potencial condrogênico e de expansão. Além disso, tais células podem ser obtidas por técnicas minimamente invasivas (DE BARI et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2005; YOSHIMURA et al., 2007; LEE et al., 2012).

Apesar de todo este potencial, até o nosso conhecimento ainda não existem estudos sobre a aplicação da técnica de microencapsulamento das CTM em HA para o reparo de lesões articulares, em equinos. Desta forma o este estudo teve como objetivo cultivar e avaliar a viabilidade de CTM_{MS} encapsuladas em um arcabouço tridimensional composto de hidrogel de alginato (HA). Adicionalmente avaliar a migração celular in vivo utilizando o nanocrystal Qtracker 655.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. A OA nos equinos

As claudicações são a maior causa de afastamento das atividades esportivas, implicando em grande prejuízo econômico para a indústria do cavalo atleta. A osteoartrite (OA) representa até 35% das causas de claudicação em equinos, sendo uma doença altamente incapacitante e de tratamento complexo, principalmente por apresentar gatilhos multifatoriais (MONTEIRO et al., 2015). Trata-se de enfermidade muito preocupante devido à solidez de instalação e a característica degenerativa da doença, concebendo um fator determinante no desempenho e no valor dos animais atletas (STASHAK, 2006; SCHLUETER & ORTH, 2004; BROMMER, 2005).

Os animais com lesão na cartilagem articular demonstram um desafio para a Medicina Veterinária tanto clínica quanto cirúrgica, em decorrência do potencial limitado de reparação desse tecido. Apesar dos avanços dos processos realizados na cirurgia artroscópica e da terapia farmacológica utilizada para o tratamento da OA, a reparação condral ainda é dependente de processos intrínsecos e extrínsecos, correlacionados principalmente com a

matriz extracelular, e constantemente o tecido de reparação se torna fibrótico (YAMADA et al., 2013; MAZOR et al., 2014).

Passado alguns anos destas afirmações, muitos avanços foram realizados. Diversos fármacos, procedimentos invasivos e não invasivos foram descobertos, otimizando a qualidade de vida do paciente, melhorando o prognóstico e recuperando o desempenho esportivo do animal com osteoartrite. Porém, o restabelecimento satisfatório de uma cartilagem hialina competente ainda não foi alcançado. Os resultados obtidos no tratamento de lesões da cartilagem articular ainda são controversos e, mesmo com o preenchimento cicatricial de defeitos condrais, na maioria dos casos o dano se estende para o osso subcondral, o processo inflamatório se mantém e o animal continua a desenvolver a doença (LEE et al., 2013). Como consequência, há o desencadeamento de inflamação cíclica, sinovite, capsulite, esclerose do osso subcondral, degradação enzimática da cartilagem articular, apoptose celular, perda de glicosaminoglicanos, destruição da matriz extracelular e da rede de colágeno. Essa série de fatores tem como resultado final a quebra estrutural e funcional da cartilagem articular, e corrobora com a característica degenerativa e progressiva da osteoartrite (MCILWRAITH, 2005; NESIC et al., 2006).

No equino adulto, a cartilagem articular é desprovida de inervação, organização linfática e vasos, o que implica no reduzido influxo de células progenitoras sanguíneas e um limitado mecanismo regenerativo (KURODA et al., 2007; HALEEM et al., 2010). A reparação depende de processos intrínsecos e extrínsecos, intimamente relacionados com a matriz extracelular. Os processos intrínsecos são limitados devido ao baixo potencial mitótico dos poucos condrócitos. Os processos extrínsecos são limitados a escassa migração de elementos mesenquimais e células progenitoras do osso subcondral (MCILWRAITH, 2005).

Na reparação de lesões cartilaginosas existe uma abundante formação de tecido fibroso e fibrocartilaginoso, contendo cerca da metade de colágeno tipo II e glicosaminoglicanos presentes em uma cartilagem normal. A formação desse tecido é extremamente limitada em zonas superficiais da cartilagem articular (FRISBIE et al., 2002; MCILWRAITH, 2005; FORTIER et al., 2010), e não confere o retorno morfofuncional desse tecido (MCILWRAITH, 2005).

Com o intuito de superar os desafios do processo de reparação da cartilagem, a comunidade científica continua pesquisando diferentes terapias e novas abordagens na tentativa de restaurar as funções e componentes estruturais de uma cartilagem articular saudável.

1.2.2. Terapia celular na osteoartrite equina

A bioengenharia, empregada como adjuvante em tratamentos convencionais, tem contribuído de forma significativa não apenas para a redução da destruição articular e da dor, mas também como uma alternativa terapêutica de regeneração (KOCH et al., 2009; VINATIER et al., 2009; GOBBI, 2011; YAMADA et al., 2013; MADEIRA et al., 2015). Atualmente, os tratamentos combinados envolvendo células tronco, arcabouços biocompatíveis e compostos bioativos estão sendo amplamente utilizados como uma forma de fornecer fonte celular e estimulação mecânica e molecular, visando a restauração morfofuncional da cartilagem articular danificada (YAMADA et al., 2013; MADEIRA et al., 2015).

Depois de tantos progressos, o emprego da terapia celular possibilitou que os pesquisadores aproximassem-se de uma reparação de cartilagem muito próxima ao ideal. Agora, novos estudos se voltam para os detalhes nesse campo de investigação, apresentando resultados positivos desde sua primeira utilização com implante autólogo de condrócitos (BRITTBERG et al., 1994; LEE et al., 2013; MADEIRA et al., 2015). As interações moleculares, a presença de inflamação, as expressões genéticas e as respostas celulares, a morfologia do tecido de reparação e as aplicações associadas são os alvos das atenções, já que o controle biológico desses indicadores poderá contribuir, de forma imperativa, para o sucesso do tratamento, tornando a cura da osteoartrite possível, mesmo com a doença já instalada (FILARDO et al., 2013; LEE et al., 2013).

Várias pesquisas foram realizadas envolvendo terapia celular no tratamento da OA, como o uso de CTM de diferentes fontes. Yamada et al. (2016) utilizaram CTM derivadas de tecido adiposo em gel de plasma rico em plaquetas na lesão condral equina e observaram que o arcabouço

tridimensional produzido a partir da polimerização da fibrina presente no PRP foi biocompatível e capaz de fixar as CTMs no local da lesão, proporcionando um microambiente protetor e rico em fatores de crescimento. Dentro do arcabouço de PRP, as CTMs migraram e se desenvolveram, indicando dessa maneira seu efeito biológico, auxiliando de forma inegável no processo de reparação condral (YAMADA et al., 2013). Esses mesmos autores relataram ainda que a associação utilizada melhorou a qualidade do tecido de reparação, devido a ação conjunta das vantagens apresentadas pela utilização das CTMs (YAMADA et al., 2016), como quimiotaxia, imunomodulação, proliferação e migração, somadas ao suporte e à alta concentração de fatores de crescimento presentes no PRP, que estimulam a produção de matriz extracelular e a diferenciação condrogênica (TEXTOR et al., 2014; XIE et al., 2014; LEE et al., 2013; YAMADA et al., 2013). Lee et al. (2013) relataram a necessidade de esclarecer o efeito do PRP sobre as CTMs, pois altas doses induzem proliferação e produção de matriz extracelular descontrolada, culminando com o efeito negativo, como a fibrose, diferentemente do que ocorre com no cultivo com alginato de sódio, que apresenta uma produção de matriz extracelular e mantém as características fenotípicas dos condrócito por longos períodos (HÄUSELMANN et al., 1994).

Outra alternativa que vem apresentando resultados promissores são as CTM derivadas de membrana sinovial (CTM_{MS}). As CTM obtidas da membrana sinovial tem potencial de auxiliar na reparação da cartilagem *in vitro* e *in vivo* (KANAMOTO et al., 2008), fato esse confirmado por McGonagle et al. (2008), que relataram que existem indícios convincentes de que estas células podem ser utilizadas de forma eficaz para promover a reparação em lesões ligamentares.

Comparada a outras fontes de CTMs, a membrana sinovial é o tecido mais próximo da cartilagem articular, tem maior capacidade condrogênica e pode ser colhida facilmente por exame artroscópico sem danificar tecidos normais (SAKAGUCHI et al., 2005, MOCHIZUKI et al., 2006). A capacidade de regeneração espontânea da cartilagem articular é bastante baixa. Por esta razão, a pesquisa de cicatrização de defeitos superficiais articulares centra-se na possibilidade de melhor reparo da cartilagem lesada através da

transplantação de células (condrócitos, células-tronco mesenquimais) e engenharia de tecidos (NECAS et al., 2010).

Domini et al. (2006) e Pei et al. (2008) relatam que as CTM_{MS} são negativas para o marcador hematopoiético CD45 e positivas para CD44, CD90, CD105. Harvanová et al. (2011) determinaram que as células aderentes derivadas de MS e fluido sinovial (FS) tinham marcadores de superfície celular semelhantes e mantiveram propriedades proliferativas após oito passagens. Estes achados indicam que as células aderentes derivadas da membrana sinovial e do líquido sinovial apresentam características típicas de CTMs. Existem estudos que revelam que as CTMs humanas derivadas MS retêm a sua capacidade proliferativa mesmo após a passagem 10 (DE BARI et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 2001).

1.2.3. Cultivo CTM MS em três dimensões (3D)

Com o avanço da engenharia de tecidos, novas oportunidades para restauração funcional e estrutural do tecido lesado estão sendo propostas. O crescimento e a diferenciação das células na engenharia de tecidos são hipoteticamente influenciados por interações com biomateriais (AWAD et al., 2004). Awad et al. (2004) estudaram as CTMs derivadas de tecido adiposo humano (CTMs TA) no que se refere ao potencial de diferenciação condrogênica. Neste estudo, as CTMs foram semeadas em diferentes hidrogéis, tais como alginato, agarose e suportes porosos de gelatina (Surgifoam®). Os autores concluíram que os vários biomateriais apoiam a diferenciação de células condrogênica derivadas de CTMs TA, e que a manipulação da composição dessas construções da engenharia de tecidos pode ter efeitos positivos sobre as suas propriedades mecânicas. Focaroli et al. (2016) utilizaram CTMs TA humano encapsuladas em alginato, relataram que as cápsulas produziram ambiente semelhante ao tecido cartilágneo e eram promissoras para uso em engenharia de tecidos. Ainda destacaram que a técnica de encapsulamento é simples e reprodutível, não interferindo na viabilidade celular.

Yang et al. (2004) relataram a necessidade que os condrócitos tem que crescer em cultivo em três dimensões (3D) para manterem sua morfologia e produção de componentes da matriz. O mesmo não ocorre quando cultivados em monocamadas: as células tendem a aderir no fundo do recipiente de cultura e passam pelo processo de desdiferenciação, no qual adquirem características morfológicas atípicas e passam a produzir componentes de matriz fibroblásticas como colágeno tipo I (BENYA & SHAFFER, 1982; MANDL, et al., 2004). Assim, para conseguir a produção de um tecido cartilaginoso funcional, é crucial evitar a desdiferenciação dos condrócitos durante o processo de engenharia de cartilagem (ZHANG et al, 2004).

O cultivo com arcabouço tridimensional se baseia em manter as células em uma matriz artificial, biodegradável, que possa suportar o crescimento da cartilagem enquanto os condrócitos e a matriz se estabelecem. O cultivo consiste em produzir células através da matriz para implantá-las num defeito articular. A matriz artificial degrada-se gradualmente em 8 a 10 semanas após o implante de cartilagem (BENTLEY & MINAS, 2001; YANG, et al., 2004).

Várias matrizes são investigadas na expansão de condrócitos *in vitro* para o reparo da cartilagem lesada. Essas matrizes incluem: arcabouços à base de colágeno (gel de colágeno tipo I e II, esponjas de colágeno tipo II), ácido polilático e ácido poliglicólico, fibrina, óxido de polietileno, peptídeos e alginato (FRAGONAS et al., 2000; KISIDAY et al., 2002).

O isolamento dos condrócitos em hidrogel de alginato têm sido o método mais indicado (FRESHNEY, 2000). O alginato é um polissacarídeo linear (n-ácido gulurônico-ácido manurônico), aniônico, capaz de gelatinizar-se de maneira reversível na presença de cálcio ou outros cátions divalentes (HÄUSELMANN et al., 1994; MULDER, 2002). A matriz de alginato pode ser utilizada tanto em implantes como em estudos da condrogênese, com grande importância no entendimento da fisiologia do tecido cartilaginoso (FRAGONAS et al., 2000). Uma das vantagens deste polissacarídeo polimerizado é a sua constituição atóxica, biocompatível e injetável em modelos animais.

Alguns autores realizaram o encapsulamento das CTMs TA em HA, no intuito de avaliar o potencial de diferenciação condrogênica, para utilização

destas células na reparação da cartilagem e observaram resultados satisfatórios pela semelhança da cápsula com a cartilagem (AWAD et al., 2004; FOCAROLI et al., 2016).

Independentemente do modo de aplicação, as CTMs, além de atuarem no local da lesão, possuem ação significativa na modulação inflamatória da membrana sinovial. Aryal (2001) relatou que a grande falha causada pela administração intra-articular ocorre devido ao rápido efluxo pela cavidade articular após a instilação. Esta limitação aparece pelo fato da cavidade articular não ser uma cavidade isolada do corpo. O aspecto macroscópico da cavidade articular como um compartimento anatômico pode levar a suposição de que o material administrado fica confinado, mas deve-se considerar que há um equilíbrio direto com a circulação (SCHURMAN & KAJIYAMA, 1985). Assim, a utilização de implantes encapsulados articulares podem ter ação local maior pelo fato de não migrarem para a circulação corpórea.

Lee et al. (2013) observaram que CTMs marcadas foram encontradas aderidas à membrana sinovial, junto à macrófagos, um dia após a aplicação intra-articular, corroborando com dados anteriormente descritos por Huurne et al. (2012), o que evidencia a capacidade de tropismo das CTMs para os locais de lesão e também demonstra que CTMs protegidas por cápsulas permanecem na articulação e não alcançam a circulação sanguínea. No estudo de Huurne et al. (2012) foi relatado ainda melhora significativa na inflamação e espessamento sinovial, e redução da formação de osteófitos e entesófitos após o tratamento intra-articular com CTMs em osteoartrites induzidas.

Bittencourt et al. (2009) estudaram condrócitos de coelho cultivados em hidrogel de alginato a 1,5% e observaram proliferação celular com aumento na viabilidade por até 4 semanas. Notaram ainda, em cortes histológicos corados com azul de toluidina e hematoxilina eosina (HE), distribuição definida dos condrócitos no hidrogel, assemelhando-se a grupos isógenos, e formação de matriz territorial. Os mesmos autores concluíram que o HA foi eficiente como arcabouço para ser usado na cultura de condrócitos, constituindo, assim, uma alternativa no reparo de lesões na cartilagem articular.

1.2.4 Identificação celular nos tecidos

O entendimento do comportamento e do potencial regenerativo das CTMs será totalmente efetivo no momento em que houver um aporte definitivo das células no local desejado (FOX et al., 2007). Neste contexto, as formas de identificação são cruciais para responder a diversas questões importantes (KOCH et al., 2008). Muitos pesquisadores utilizam técnicas de imunofluorescência ou imunohistoquímica para identificar os nichos das CTM (JONES & McGONAGLE, 2007).

Nos últimos anos houve um aumento crescente na busca por métodos fluorescentes capazes de realizar a detecção das células (GWINN & VALLYATHAN, 2006). Esta busca cresceu com o advento da nanotecnologia, que faz uso de nanopartículas aplicadas a novas terapias e marcação molecular, além de utilizar métodos de detecção óptica (BORM, 2006).

Os nanocristais são materiais que podem ser observados utilizando qualquer microscopia fluorescente (epifluorescência, confocal e multifocal), brilhando como sinais de néon, durante até 48 horas (BORM, 2006). Por definição, o nanocristal pode ser detectado por pelo menos quatro gerações celulares (DONALDSON et al., 2007), não são tóxicos e sua fluorescência é ativa por tempo 100 vezes maior quando comparado aos corantes orgânicos (MARSH et al., 2007). O controle da cor emitida pelos QDs pode ser alterada de acordo com o seu tamanho: os pontos pequenos emitem luz azul, verde ou amarela e pontos maiores brilham nas cores laranja, vermelha ou cinza (SIMBERG et al., 2007). A marcação ocorre sem causar efeitos deletérios à célula, através do envolvimento e interação do marcador com a membrana celular, ocorrendo endocitose e quimiotaxia (AZZAZY et al., 2006).

Resultados com CTM marcadas com nanocristais fluorescentes Q-tracker foram úteis na identificação de células implantadas em defeitos ósseos em cães sete dias após o tratamento (OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, estudos mostraram que a marcação não interfere na viabilidade, capacidade proliferativa e diferenciação celular (COSTA, 2009). O tratamento de infarto de miocárdio com CTM realizado por Rosen et al. (2007) sugeriu que as células transplantadas possuem capacidade de migração em direção ao tecido lesado,

e são capazes de se incorporar neste tecido, podendo ser visualizadas após um período de 8 semanas. Não foram encontrados em literatura trabalhos que avaliassem por marcação com nanocristal o comportamento das CTM nas articulações dos equinos.

Carvalho et al. (2014) utilizando o Qtracker para avaliação da migração das CTMs em tendinites induzidas em equinos, concluíram que os nanocristais apresentaram ser um valioso marcador *in vivo* de CTMs para serem utilizados no tratamento da tendinite. Embora a migração de CTMs para a corrente sanguínea tenha sido observada, não foi possível identificar as células marcadas nos tendões não tratados.

Oliveira et al. (2014) avaliaram a marcação das CTMs com nanocristal antes e após o implante em lesões tendíneas experimentais do tendão flexor digital superficial (TFDS) de equinos. Observando que as CTMs marcadas e injetadas no tecido tendíneo mantiveram sua fluorescência sete dias após seu implante, não ocorrendo migração para o membro contralateral. O uso do nanocristal para a marcação das CTMs derivadas da medula óssea equina mostrou-se efetivo pelo fato de essa nanopartícula não ter alterado a viabilidade celular e por ela ter permanecido ativa durante o período implantado.

REFERÊNCIAS

Anderson JA, Little D, Toth AP, Moorman CT, Tucker BS, Ciccotti MG, Guilak F. Stem cell therapies for knee cartilage repair: the current status of preclinical and clinical studies. *Am J Sports Med* 2014; 42(9):2253-61.

Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimple JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adiposederived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004;25(16):3211–3222.

Azzazy HM, Mansour MM, Kazmierczak SC. Nanodiagnostics: a new frontier for clinical laboratory medicine. *Clin Chem* 2006; 52(7):1238-46.

Bentley G, Minas T. Revisão clínica: tratar a lesão articular em jovens. *Br. Med. J.*, London 2001; 10.

Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982;30(1):215-24.

Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Ferreira RR, Guilherme GRB, Moroz A, Deffune E. Cultura de Condrócitos em arcabouço tridimensional: hidrogel de alginato. *Acta Ortop Bras* 2009; 17(4):242-246.

Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol* 2006; 14(3):11.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331(14):889-95.

Brommer H, Brama PA, Laasanen MS, Helminen HJ, van Weeren PR, Jurvelin JS. Functional adaptation of articular cartilage from birth to maturity under the influence of loading: a biomechanical analysis. *Equine Vet J* 2005;37(2):148-54.

Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* 2011; 13(4):419-30.

Carvalho AM, Yamada AL, Golim MA, Álvarez LE, Hussni CA, Alves AL. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet J* 2014;46(5):635-8.

Costa LT. Avaliação da migração e integração de células-tronco mesenquimais ao tecido retiniano lesado. Estudo experimental em ratos wistar. Tese

(Doutorado), 111p. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; 2009.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1928–1942

Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA. Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 2004;61:727-728.

Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiari M, Kon E. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013;21(8):1717-29.

Focaroli S, Teti G, Salvatore V, Orienti I, Falconi M. Calcium/Cobalt Alginate Beads as Functional Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Stem Cells International* 2016 (12).

Fortier LA, Potter HG, Rickey EJ, Schnabel LV, Foo LF, Chong LR, Stokol T, Cheetham J, Nixon AJ. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92(10):1927-37.

Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol* 2007;137(6):491-502.

Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, Vittur F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*. 2000;21(8):795-801.

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3rd. ed. New York: Wiley Liss; 2001.

Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* 2002;9(1):12-20.

Frisbie DD, Kawcak CE, Werpy NM, Park RD, McIlwraith CW. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2007; 68(3):290-296.

Frisbie DD, Kisiday JD, Kawcak CE, Werpy NM, McIlwraith CW. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *J Orthop Res* 2009; 27(12):1675-80.

Gobbi A, Karnatzikos G, Scotti C, Mahajan V, Mazzucco L, Grigolo B. One-step cartilage repair with bone marrow aspirate concentrated cells and collagen matrix in full-thickness knee cartilage lesions: results at 2 year follow up. *Cartilage* 2011;2(3):286-299.

Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect* 2006;114(12):1818-25.

Haleem AM, Singergy AA, Sabry D, Atta HM, Rashed LA, Chu CR, El Shewy MT, Azzam A, Abdel Aziz MT. The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage* 2010;1(4):253-261.

Harvanová D, Tóthová T, Sarišský M, Amrichová J, Rosocha J. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha)* 2011;57(3):119-24.

Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 1):17-27.

Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, de Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noël D, Casteilla L, Jorgensen C, van den Berg W, Van Lent PL. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64(11):3604-13.

Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(2):126-31.

Kanamoto T, Nakamura N, Nakata K, Yoshikawa H. Articular cartilage regeneration using stem cells. *Clin Calcium* 2008;18(12):1744-9.

Kaur S, Singhal B. When nano meets stem: the impact of nanotechnology in stem cell biology. *J Biosci Bioeng* 2012;113(1):1-4.

Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, Grodzinsky AJ. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9996-10001.

Koch TG, Berg LC, Betts DH. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J* 2008;49(10):1009-17.

Koch TG, Berg LC, Betts DH. Current and future regenerative medicine - principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J* 2009; 50(2):155-165.

Kurth T, Hedbom E, Shintani N, Sugimoto M, Chen FH, Haspl M, Martinovic S, Hunziker EB. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(10):1178-89.

Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(2):226-31.

Lee JC, Lee SY, Min HJ, Han SA, Jang J, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovium-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a novel injectable gel can repair osteochondral defects in a rabbit model. *Tissue Eng Part A* 2012;18(19-20):2173-86.

Lee JC, Min HJ, Park HJ, Lee S, Seong SC, Lee MC. Synovial membrane-derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model. *Arthroscopy* 2013;29(6):1034-46.

Lent PLV, Berg WBVD. Mesenchymal stem cell therapy in osteoarthritis: advanced tissue repair or intervention with smouldering synovial activation? *Arthritis Research & Therapy* 2013; 15:112

Lima RAS, Shiota R, Barros GSC. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006: 250.

Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JM. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol* 2015; 33(1):35-42.

Mandl EW, Van der Veen SW, Verhaar JA, van Osch GJ. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng* 2004;10(1-2):109-18.

Marsh JN, Partlow KC, Abendschein DR, Scott MJ, Lanza GM, Wickline SA. Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: quantification of the concentration dependence of contrast enhancement for binding to sparse cellular epitopes. *Ultrasound Med Biol* 2007;33(6):950-8.

Mazor M, Lespessailles E, Coursier R, Daniellou R, Best TM, Toumi H. Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update. *J Cell Mol Med* 2014; 18(12):2340-50.

McGonagle D, Jones E. A potential role for synovial fluid mesenchymal stem cells in ligament regeneration. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(8):1114-1116.

McIlwraith CW. From arthroscopy to gene therapy – 30 years of looking in joints. In: *Proceedings of the Annual Convention - American Association of Equine Practitioners* 2005; 51:65-113.

McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 2011; 27(11):1552-61.

McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res* 2012; 1(11):297–309.

Ministério da Agricultura e Pecuária. Criação de Equinos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>, acesso: 28 setembro 2016.

Milano G, Sanna Passino E, Deriu L, Careddu G, Manunta L, Manunta A, Saccomanno MF, Fabbriani C. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(7):971-80.

Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium and adipose synovium derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum* 2006; 3: 843-853.

Monteiro SO, Bettencourt EV, Lepage OM. Biologic Strategies for Intra-Articular Treatment and Cartilage Repair. *J Equine Vet Sci* 2015; 35(3):175-190.

Mulder L. Cell adhesion on alginate scaffolds for tissue engineering of aortic valve – a review. *Faculty Biomedical Engineering - Eindhoven University Technology* 2002:22-34.

Nečas A, Plánka L, Srnc R, Crha M, Hlučilová J, Klíma J, Starý D, Křen L, Amler E, Vojtová L, Jančář J, Gál P. Quality of newly formed cartilaginous tissue in defects of articular surface after transplantation of mesenchymal stem cells in a composite scaffold based on collagen I with chitosan micro- and nanofibres. *Physiol. Res* 2010; 59: 605-614.

Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58(2):300-22.

Nixon AJ, Rickey E, Butler TJ, Scimeca MS, Moran N, Matthews GL. A chondrocyte infiltrated collagen type I/III membrane (MACI® implant) improves cartilage healing in the equine patellofemoral joint model. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23(4):648-660.

Nöth U, Steinert AF, Tuan RS. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4(7):371-80.

Oliveira PGG, Carvalho AM, Yamada ALM, Maia L, Freitas NPP, Watanabe MJ, Landim-Alvarenga FC, Alves ALG. Avaliação da migração das células

progenitoras após terapia da tendinite equina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 2014; 66(4):1033-1038.

Oliveira DM, Almeida BO, Marti LC, Sibov TT, Pavon LF, Malheiros DMAC, Campos AH. Labeling of human mesenchymal stem cells with *quantum dots* allows tracking of transplanted cells engrafted in infarcted pig hearts. Einstein 2009; 7(3):284-289.

Oliveira GK, Raiser AG, Olsson D, Salbego FZ, Martins DB, Dezengrine R, Santos Júnior EB, Rappeti J, Trindade LB, Tognoli GK, Pippi NL, Sausen L. Células-tronco mononucleares autólogas e proteínas óssea morfogénica na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 2010; 62(1):72-79.

Parak WJ, Pellegrino T, Plank C. Labelling of cells with quantum dots. Nanotechnology 2005;16(2):R9-R25.

Pei M, He F, Vunjak-Novakovic G. Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. Differentiation 2008; 76: 1044-1056.

Raheja LF, Galuppo LD, Bowers-Iepore J, Dowd JP, Tablin F, Yellowley CE. Treatment of Bilateral Medial Femoral Condyle Articular Cartilage Fissures in a Horse Using Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. J Equine Vet Sci 2011;31(3):147-154.

Rosen AB, Kelly DJ, Schuldt AJ, Lu J, Potapova IA, Doronin SV, Robichaud KJ, Robinson RB, Rosen MR, Brink PR, Gaudette GR, Cohen IS. Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative in vivo three-dimensional fluorescence analysis. Stem Cells 2007;25(8):2128-38.

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum 2005;52(8):2521-9.

Schlueter AE, Orth MW. Equine osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes. Equine and Comparative Exercise Physiology 2004; 1(4):221–231.

Schurman DJ, Kajiyama G. Antibiotic absorption from infected and normal joints using a rabbit knee joint model. Journal of Orthopaedic Research 1985;3(2):185-8.

Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. Trends Immunol 2012; 33(3):136-43.

Simberg D, Duza T, Park JH, Essler M, Pilch J, Zhang L, Derfus AM, Yang M, Hoffman RM, Bhatia S, Sailor MJ, Ruoslahti E. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(3):932-6.

Stashak TD. Claudicação em equinos. 5a.ed. São Paulo: Roca, 2006. 1093p.

Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, Gent T, Freeman S, Foster N, Barrett-Jolley R, Mobasher A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*. 2009; 179:10-24.

Textor JA, Murphy KC, Leach JK, Tablin F. Ultrastructure and growth factor content of equine platelet-rich fibrin gels. *Am J Vet Res* 2014;75(4):392-401.

Tsuzuki N, Oshita N, Seo JP, Yamada K, Haneda S, Furuoka H, Tabata Y, Sasaki N. Effect of platelet-rich plasma-incorporated gelatin hydrogel microspheres and subchondral drilling on equine cartilage defects. *J Equine Vet Sci* 2014;34(6):820-824.

Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 2009;27(5):307-14.

Wu X, Bruchez MP. Labeling cellular targets with semiconductor quantum dot conjugates. *Methods Cell Biol* 2004;75:171-83.

Xie X, Zhang C, Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy* 2014;16(204):1-15.

Yamada ALM, Carvalho AM, Moroz A, Deffune E, Watanabe MJ, Hussni CA, Rodrigues CA, Alves ALG. Mesenchymal stem cell enhances chondral defects healing in horses. *Stem Cell Discovery* 2013; 3(4)218-225.

Yamada ALM, Alvarenga ML, Brandão JS, Watanabe MJ, Rodrigues CA, Hussni CA, Alves ALG. Arcabouço de PRP-gel associado a células tronco mesenquimais: uso em lesões condrais em modelo experimental equino. *Pesq. Vet. Bras* 2016;36(6):461-467.

Yang IH, Kim SH, Kim YH, Sun HJ, Kim SJ, Lee JW. Comparison of phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* 2004;45(5):891-900.

Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007;327(3):449-62.

Zhang Z, McCaffery JM, Spencer RG, Francomano CA. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *J Anat* 2004;205(3):229-37.

Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo- Kinne E, Emmrich F, Kinne RW. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture – primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res.*2001; 3: 72-76.